



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Propuesta de proyecto:

Análisis de los efectos teratogénicos del ácido
valproico en el desarrollo del tubo neural del
pez cebra y los efectos protectores de la
vitamina C

Ana González Arias

Trabajo de fin de Grado
Grado en Biología



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS

ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Trabajo de Fin de Grado que presenta la alumna Ana González
Arias bajo la dirección de Dra. Mónica Folgueira Otero.

A Coruña, Febrero 2017

INDICE:

RESUMEN.....	4
A. PROPUESTA CIENTÍFICA	6
1.Los antecedentes y estado actual de los conocimientos científico-técnicos de la materia específica del proyecto.	6
1.1. Teratogenicidad de los medicamentos anticonvulsionantes.....	6
1.2. Teratogenicidad del ácido valproico (VPA).....	8
1.3. Vitamina C como antioxidante natural.....	10
1.4. Organismo utilizado.....	10
2. La hipótesis de partida y los objetivos generales perseguidos.....	16
3. Los objetivos específicos.....	16
4. El detalle de la metodología propuesta.....	17
4.1 Estudio de los efectos del ácido valproico en el desarrollo del tubo neural de embriones y larvas de pez cebra transgénicos Tg (1.4dlx5a-dlx6a: GFP) ^{ot1}	17
4.1.A. Obtención de los huevos fecundados de la línea transgénica Tg (1.4dlx5a-dlx6a: GFP) ot1.	17
4.1.B. Exposición de embriones Tg (1.4dlx5a-dlx6a: GFP) ^{ot1} a ácido valproico.....	18
4.1.C. Análisis del fenotipo de los embriones mediante la observación a estereomicroscopio.....	19
4.1.D Estudio del fenotipo tras inmunofluorescencia frente a GTP y ZO-1.....	19
4.2. Estudio de los efectos del ácido valproico en el tubo neural de embriones y larvas de pez cebra transgénicos Tg (1.4dlx5a-dlx6a: GFP) al añadir al medio un antioxidante natural (vitamina C).	20
5. La descripción de los medios materiales, infraestructuras y equipamientos singulares.....	21
5.1. Mantenimiento de los peces progenitores.	21
5.2. Microscopio de fluorescencia y microscopio confocal.....	22
6. Un cronograma claro y preciso de las fases e hitos previstos en relación con los objetivos planteados en la propuesta.....	22
B. IMPACTO ESPERADO DE LOS RESULTADOS	25
1. Descripción del impacto científico-técnico social y/o económico que se espera de los resultados del proyecto, tanto a nivel nacional como internacional.....	25
2. El plan de difusión e internacionalización en su caso de los resultados.....	25
3. Si se considera que puede haber transferencia de resultados, se deberán identificar los resultados potencialmente transferibles y detallar el plan previsto para la transferencia de los mismos.....	26
C. IMPLICACIONES ÉTICAS Y/O DE BIOSEGURIDAD	27
1. Una descripción de los aspectos éticos referidos a la investigación que se propone.....	27
2. Una explicación de las consideraciones, procedimientos o protocolos a aplicar en cumplimiento de la normativa vigente, así como una descripción de las instalaciones y las preceptivas autorizaciones de las que se dispone para la ejecución del proyecto.	27

RESUMEN

El ácido valproico (VPA) es el principal anticonvulsionante utilizado contra la epilepsia. Sin embargo, durante la gestación actúa como teratógeno en las etapas iniciales del embarazo, principalmente ocasionando malformaciones en el sistema nervioso central (SNC). Esto es debido a un aumento de las especies reactivas del oxígeno, pudiéndose contrarrestar añadiendo un antioxidante natural. El objetivo de este proyecto es determinar si la vitamina C disminuye el efecto teratógeno sobre el tubo neural del VPA en embriones de pez cebra transgénicos tratados con diferentes concentraciones de este anticonvulsionante. A las 96 horas post-fecundación se realizará un análisis de la morfología del tubo neural bajo el estereomicroscopio. También se realizará una técnica de inmunofluorescencia para la detección de la proteína Zonula Occludens-1 (ZO-1) para poder observar la morfología del ventrículo del tubo neural. Esto permitirá una mejor observación de malformaciones bajo el microscopio de fluorescencia tras las exposiciones al anticonvulsionante y al agente antioxidante.

Palabras clave: Ácido valproico, vitamina C, pez cebra, tubo neural.

RESUMO

O ácido valproico (VPA) é o principal anticonvulsionante empregado contra a epilepsia. Sin embargo, durante a xestación actúa como teratóxeno nas etapas iniciais do embarazo, principalmente ocasionando malformacións no sistema nervioso central (SNC). Isto é debido a un aumento das especies reactivas do osíxeno, sendo posible contrarrestar engadindo un antioxidante natural. O obxectivo de este proxecto é determinar si a vitamina C diminúe o efecto teratóxeno sobre o tubo neural do VPA en embrións de peixe cebra transxénicos tratados con diferentes concentracións de este anticonvulsionante. Ás 96 horas post-fecundación realizarase un estudo baixo o estereomicroscopio. Tamén realizaremos unha técnica de inmunofluorescencia para a detección da proteína Zonula Occludens-1 (ZO-1) para poder observar a morfoloxía do ventrículo do tubo neural. Isto permitirá una mellor observación de malformacións baixo o microscopio de fluorescencia tras as exposicións ó anticonvulsionante e ó axente oxidante.

Palabras clave: Ácido valproico, vitamina C, peixe cebra, tubo neural

SUMMARY

Valproic acid (VPA) is the main anticonvulsant used for epilepsy. However, it acts as a teratogenic agent during early pregnancy, causing malformations in the central nervous system of the embryo (CNS). This teratogenic effect is caused by the increase in reactive oxygen species, which can be countered with the supplementation of vitamin C. The aim of this project is to determine if vitamin C

minimizes the teratogenic effect of VPA in the neural tube of transgenic zebrafish embryos treated with different concentrations of this anticonvulsant. At 96 hours post-fertilization, we will study the larvae under a stereomicroscope. In addition, we will perform an immunofluorescent staining against the Zonula Occludens-1 (ZO-1) protein in order to observe ventricular surface of the neural tube. This will allow a better analysis of neural malformations under the fluorescence microscope after the exposure to the anticonvulsant and the antioxidant agent.

Key words: Valproic acid, vitamin C, zebra fish, neural tube

A. PROPUESTA CIENTÍFICA

1. Los antecedentes y estado actual de los conocimientos científico-técnicos de la materia específica del proyecto.

1.1. Teratogenidad de los medicamentos anticonvulsionantes.

La mayoría de los medicamentos administrados durante el embarazo son para la mujer, el embrión es receptor simplemente por casualidad. No existe una barrera placentaria específica frente a fármacos, de manera que el embrión o feto queda expuesto inevitablemente a estas sustancias. Un agente beneficioso o inocuo para la madre, puede ser nocivo e incluso mortal durante el desarrollo embrionario. La prescripción de medicamentos es un hábito muy frecuente durante el embarazo y casi todas las mujeres en estado de gestación están expuestas a algún fármaco (Marín et al., 2010). A pesar de esto se dispone de pocos datos sobre su eficacia y seguridad en este grupo de pacientes. La información sobre la seguridad de estos productos se encuentra reducida en las mujeres embarazadas, ya que por razones éticas casi no se realizan estudios clínicos y solo un pequeño grupo de medicamentos han sido específicamente probados para la seguridad y eficacia durante el embarazo (Meador et al., 2010). La información sobre la toxicidad o efectos adversos de ciertos medicamentos durante la gestación proviene principalmente de la extrapolación de datos de estudios preclínicos y observacionales, por lo que durante el embarazo se recomienda a la madre no tomar medicamentos o no abusar de estos (Marín et al., 2010). Pero en ocasiones una mujer embarazada no puede prescindir del uso de los medicamentos, principalmente debido a una enfermedad crónica que necesita ser tratada.

El presente proyecto que se propone está dirigido al estudio del efecto durante el desarrollo embrionario de un fármaco, el ácido valproico (VPA), utilizado para el tratamiento de la epilepsia durante el embarazo. La epilepsia es un trastorno crónico caracterizado por convulsiones recurrentes impredecibles, desencadenadas por una actividad eléctrica aberrante de un grupo de neuronas hiperexcitables, localizadas en lo que se conoce como foco epiléptico (Hill et al., 2011). Se ha observado que las personas epilépticas tienen una cantidad mayor de neurotransmisores activos (sustancias encargadas de conducir el impulso nervioso entre las neuronas) o una cantidad más baja de inhibidores de dichos neurotransmisores, lo cual también aumenta la actividad neuronal. Entre estos neurotransmisores denominados inhibidores uno de los más importantes es el ácido gammaaminobutírico (GABA), que juega un importante papel ya que muchas crisis epilépticas suelen desencadenarse por baja presencia de GABA. La epilepsia afecta a la población general en un 0.6%-1.0% y es la patología neurológica más frecuente en la mujer embarazada, por lo que aproximadamente 1 de 250 embarazos está expuesto a fármacos antiepilépticos

(Contreras et al., 2013). La mayoría de las mujeres gestantes con epilepsia tienen niños sanos. Sin embargo, se han descrito mayor número de malformaciones en el tubo neural en este grupo debido al uso de medicamentos anticonvulsionantes. La tasa de malformaciones en la población general se encuentra en torno al 1-3% mientras que esta tasa aumenta en hijos de madres que reciben anticonvulsionantes, llegando al 4-6%. (K.J. Meador et al., 2010). Esto es debido a la elevada teratogenidad de los fármacos anticonvulsionantes (Forsberg et al., 2011). Estudios epidemiológicos sugieren que los hijos de mujeres epilépticas tienen un riesgo mayor de sufrir malformaciones durante su desarrollo comparado con la población general. Los defectos del tubo neural son las malformaciones congénitas más comunes, causados por formaciones embriológicas anormales, derivadas del cierre defectuoso del tubo neural (Forsberg et al., 2011). Sin embargo, los resultados de estos estudios presentan una gran variabilidad, que podrían atribuirse a distintas variables, como los métodos de análisis utilizados, la duración, el tamaño muestral, la duración del seguimiento a los recién nacidos, etc.

Entre 1970 y 1980 los fármacos antiepilépticos más utilizados para el tratamiento de las crisis convulsivas eran fenobarbital, fenitoína, carbamazepina y el ácido valproico (VPA), los cuales fueron asociados con malformaciones mayores. En 1981, la espina bífida inducida por el valproato fue descrita por primera vez, un riesgo estimado ahora entre el 2-3% y durante los años 80 se acumularon informes de esta y otras malformaciones importantes resultantes del tratamiento (Wlodarczyk et al., 2012). En 1990 se observó que la carbamazepina producía un aumento de las malformaciones en la descendencia de las mujeres expuestas, registrándose un aumento en los casos de espina bífida y microencefalía en los hijos de estas pacientes (Wlodarczyk et al., 2012). La carbamazepina sigue siendo uno de los medicamentos más utilizados hoy en día para el tratamiento de las convulsiones junto con el VPA (Hill et al., 2011).

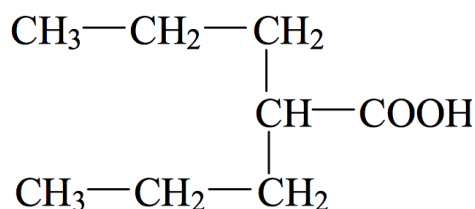
Recientemente se han introducido nuevos fármacos antiepilépticos o anticonvulsionantes, como la lamotrigina, topiramato, levetiracetam y zonisamida (Wlodarczyk et al., 2012). Aunque ciertos estudios indican que estos nuevos fármacos son más seguros que los tradicionales (Holmes et al., 2008) aún existe controversia en cuanto a sus efectos sobre la mujer embarazada y el embrión. A día de hoy la lamotrigina y el topiramato son los dos fármacos que se prescriben mayoritariamente a la mujer embarazada, a pesar que en el artículo llevado a cabo por Bromley et al. no arrojaba luces sobre los posibles efectos. Bromley et al. (2016) llevaron a cabo un estudio en 171 niños de mujeres epilépticas que habían tomado durante su embarazo VPA o bien lamotrigina o topiramato. Los resultados muestran por el momento que la lamotrigina y topiramato no tienen ningún impacto perceptible en el desarrollo del tubo neural de los infantes. Sin embargo, otros trabajos recientes demostraron que la lamotrigina provoca un aumento de riesgo de fisura labial y paladar hendido

(Holmes et al., 2008) y el topiramato está asociado con malformaciones como la fisura labial y con bajo peso al nacer (Obican et al., 2011).

1.2. Teratogenicidad del ácido valproico (VPA).

El ácido valproico sigue siendo el anticonvulsivo más prescrito para tratar las crisis epilépticas ya que es eficaz ante todos los tipos de crisis, además su mecanismo de acción no se basa en actuar sobre un receptor farmacológico, sino que ejerce su acción sobre la enzima GABA-transaminasa y semialdehído succínico deshidrogenasa, enzimas relacionadas con la degradación de GABA, manteniendo así altos los niveles del neurotransmisor. También produce un incremento significativo de la actividad de glutamato descarboxilasa (GAD), aumentando la síntesis de GABA en regiones cerebrales como la sustancia negra, zona involucrada en el control de la generación y propagación de las convulsiones.

El ácido valproico (VPA) se encuentra disponible en diferentes preparaciones (ácido valproico, valproato de sodio, valproato de magnesio, divalproato de sodio), pero el principio activo siempre es el ion valproato, que en el estómago se convierte rápidamente en ácido valproico (Ornóy, 2009). Es un ácido graso ramificado de cadena corta (Fig.1), que, a diferencia de otros anticonvulsivos, carece de anillo aromático y nitrógeno. Fue sintetizado por primera vez en 1882 (Burton, 1882) y fue utilizado como disolvente orgánico durante años, hasta que se descubrió su actividad como anticonvulsivo. El tratamiento con VPA para la epilepsia fue aprobado por primera vez en Francia en 1967 (Ornóy, 2009). Desde entonces ha sido el medicamento con mayor número de prescripciones para el tratamiento de la epilepsia generalizada y hoy en día también es utilizado para el tratamiento del trastorno bipolar y migrañas (Calabresi et al., 2007).



Ácido Valproico
(ácido di-n-propilacético)

Figura 1: formulación del ácido valproico

El VPA es considerado por la Food and Drugs Administration (FDA) como un medicamento de categoría D, es decir, hay evidencias de riesgo fetal en

humanos, pero las ventajas del uso en mujeres embarazadas pueden ser aceptables a pesar del riesgo (FDA, 2006). Presenta un riesgo aumentado de malformaciones que han sido estimadas entre un 6 hasta un 18% respecto a la descendencia de mujeres no tratadas con VPA (Obican et al., 2011) siendo uno de los anticonvulsivos con mayor efecto teratogénico. Los daños que el VPA puede causar a la descendencia como teratogénico los podemos clasificar en 3 grandes grupos, siendo el VPA el anticonvulsivo más asociado a los defectos del sistema nervioso central:

1. Anomalías congénitas a nivel cardíaco, fisura labio-palatina, anomalías del tracto urinario y de las extremidades.
2. Síndrome fetal del ácido valproico: afecta al sistema nervioso central, siendo la espina bífida la malformación más frecuente.
3. Desórdenes del cognitivos: afectando a la función cognitiva y al comportamiento, pudiendo incluso causar autismo.

La Academia Americana de Neurología recomienda evitar el uso de VPA durante la gestación y reemplazarlo por otro medicamento siempre y cuando las condiciones del paciente lo permitan. Sin embargo, a aquellas gestantes que les sea imprescindible la ingesta de VPA para manejar su enfermedad no es recomendable suspender el tratamiento. Los ajustes de la dosis se realizarán durante el embarazo y se describen según la observación clínica. Además, es preferible administrar en dosis divididas el fármaco para evitar los picos de concentración sérica que se relacionan con la teratogenicidad del VPA.

Hasta la fecha, el mecanismo por el cual el VPA induce la teratogenicidad no es bastante claro. Una hipótesis propone que este ácido está asociado a un incremento de las especies reactivas del oxígeno y/o una disminución de los antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos. (Dorado et al., 2003). En condiciones normales las células producen pequeñas cantidades de especies reactivas de oxígeno a nivel de las mitocondrias, como producto del metabolismo del oxígeno molecular durante el transcurso de la fosforilación oxidativa (Dorado et al., 2003). La capacidad de amortiguación de estas especies reactivas se basa en los sistemas antioxidantes, constituidos por radicales libres, como el tocoferol (vitamina E), la vitamina C, carotenoides y flavonoides, o bien por complejos enzimáticos, como la catalasa y glutatión peroxidasa.

Cuando estas especies de oxígeno reactivo superan la capacidad de amortiguación de la célula, la célula entra en estrés oxidativo, potencialmente induciendo daños en el DNA, RNA, proteínas y lípidos (Dorado et al., 2003). Esto ocurre en cualquier tipo celular, pero el sistema nervioso es especialmente susceptible a los ataques de las especies reactivas del oxígeno ya que es el mayor metabolizador de O_2 y posee mecanismos oxidantes relativamente débiles.

1.3. Vitamina C como antioxidante natural.

Como hemos visto en el apartado anterior una posible causa de la teratogenicidad del ácido valproico se basa en el aumento de las especies reactivas de oxígeno, por lo que la vitamina C, gracias a su poder antioxidante, será capaz de amortiguar el efecto teratogénico en el organismo.

La vitamina C (ácido ascórbico) (Fig.2) es un nutriente esencial en los animales, un importante cofactor en reacciones enzimáticas y un poderoso antioxidante (Kirkwood et al., 2012). En el presente estudio es importante destacar el papel del ácido ascórbico (AA) como antioxidante, pudiendo actuar bien de forma directa o de forma indirecta, facilitando el reciclado de la vitamina E (alfa-tocoferol) (Kirkwood et al., 2011).

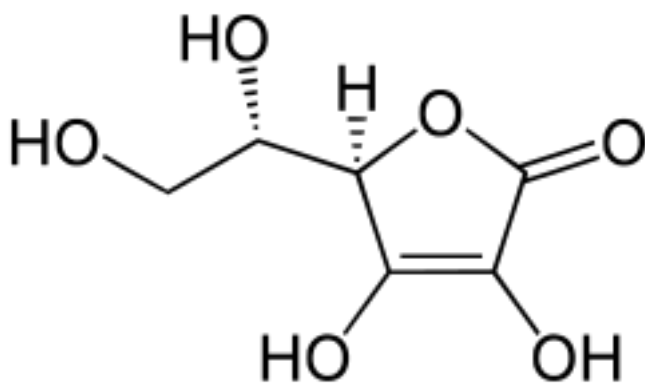


Figura 2: formulación de la vitamina C

Una de las principales dificultades del estudio en el laboratorio de las funciones del AA en animales es que estos son capaces de sintetizarla, excepto el ser humano. El ser humano, junto con los primates y cobayas, son los únicos mamíferos incapaces de sintetizar vitamina C, por lo que dependen de su dieta para el aporte de AA, esto es debido a la falta del gen codificante para la enzima gluconolactona oxidasa, la responsable de la conversión de L-gulono-g-lactona en AA.

El pez cebra (*Danio rerio*) es un organismo modelo único para el estudio de la función del AA. Esto es debido a que el pez cebra y otros teleósteos también carecen del gen responsable de codificar la enzima gluconolactona oxidasa, por lo que el aporte de vitamina C se basa principalmente en su dieta (Kirkwood et al., 2011).

1.4. Organismo utilizado.

La evaluación de la teratogenicidad y toxicidad de fármacos se basa en la exposición al mismo de modelos animales. Las guías regulatorias para la introducción de medicamentos y pesticidas en el mercado requieren la

evaluación en un animal roedor y otro no roedor (Daston, 2011). Hoy en día, cada vez es más utilizado el pez cebra en estudios de toxicidad de fármacos y pesticidas debido a su ciclo vital corto y alta fertilidad. La OCDE y la UE regulan y aceptan el pez cebra para estudios de toxicidad (OCDE, 2013; UE, 2010). Existen en la actualidad numerosos trabajos que evalúan la teratogenidad tanto de metales pesados como de herbicidas, plaguicidas o diversos medicamentos (Hill et al., 2005). Dado que los procesos del desarrollo embrionario están altamente conservados en vertebrados, el pez cebra es un buen predictor de teratogenidad en humanos (Hill et al., 2005).

El pez cebra (*Danio rerio*, Familia *Cyprinidae*, Orden *Cypriniformes*, División *Teleostei*, Clase *Actinopterygii*, Superclase *Gnathostomata*, Nelson, 2006) (Fig. 3) es un pez teleósteo nativo de la India que suele habitar los ríos de Asia central, pero también es una especie fácil de encontrar en los acuarios.



Figura 3: Pez cebra. Tomado de: <http://www.peceswiki.com/imagenes-descripcion-fisica-del-pez-cebra-jpg>

El pez cebra tiene pequeño tamaño, lo que permite tener un mayor número de individuos en un menor espacio. Además, su mantenimiento es relativamente barato (entre 100 y 1000 veces menos costoso que el mantenimiento de ratones de laboratorio) (Nelson, 2006). Es una especie ovípara y los huevos se desarrollan fuera del cuerpo de la hembra, lo que permite que se expongan fácilmente a los agentes a testar en estudios de toxicidad (Hill et al., 2005). Cada hembra puede depositar más de 200 huevos por semana, lo que nos permite obtener una elevada descendencia en un corto periodo de tiempo. Además, los huevos son transparentes, lo que nos permite observar al microscopio todos los estadios de su desarrollo, una característica importante para el estudio de fenotipos durante el desarrollo del proyecto.

Otra de las ventajas que hace que este teleosteo sea idóneo para estudios de toxicidad es que el pez cebra tiene un alto grado de similitud genética con el ser humano. El conocimiento del genoma completo de este organismo reveló que el 70% de los genes humanos tienen un homólogo en el pez cebra, aumentando hasta un 84% la homología cuando se trata de genes asociados a enfermedades (Hill et al., 2005). El conocimiento completo del genoma del pez cebra, entre otros factores, ha permitido la creación de un elevado número de líneas transgénicas que se utilizan con diversos objetivos. La utilización de líneas transgénicas en estudios de toxicidad permite analizar más con mayor detalle y más rápidamente la aparición de determinados fenotipos en estudios de toxicidad. Una de dichas líneas será utilizada en este proyecto: Tg (1.4dlx5a-dlx6a: GFP)^{ot1}. Para la producción de este transgénico, un fragmento de la región intergénica del gen dlx4/dlx6 de pez cebra fue insertado entre el promotor de β -globina y la secuencia codificadora de la fluoresceína verde fluorescente (GFP) (Zerucha et al., 2000). Este transgénico expresa la GFP en neuroblastos y neuronas diferenciadas de varias regiones del encéfalo y de la médula espinal (Folgueira et al., 2012). Por tanto, permitirá estudiar en más detalle las posibles malformaciones que puedan aparecer como consecuencia de la exposición a ácido valproico, así como los efectos neuroprotectores de la vitamina C.

Dado que el embrión de pez cebra es transparente y de desarrollo rápido, el estudio del desarrollo del tubo neural y sus malformaciones asociadas a la exposición a tóxicos se pueden realizar fácilmente al microscopio. En condiciones normales, la formación del tubo neural o neurulación comienza a las 10 horas post-fecundación (Schimtz et al., 1993). En los peces teleosteos la neurulación se considera de tipo secundario. Durante la neurulación, la placa neural se aproxima hacia la línea media y las células se condensan para formar una masa sólida de células. Posteriormente esta masa cavita para formar los ventrículos y el canal central, dando así lugar a un tubo hueco (Geldmacher-Voss et al., 2003). La cavitación se produce hacia las 18-20 hpf a fin de generar un tubo maduro con clara organización dorso-ventral y polaridad apico-basal. Para el estudio de la formación del tubo neural y los efectos del ácido valproico. En este proyecto utilizaremos el transgénico Tg (1.4dlx5a-dlx6a: GFP)^{ot1} junto con el marcador apical Zonula Occluden- 1 (ZO-1). ZO-1 es una proteína que forma parte de las uniones estrechas entre células. Será utilizado aquí para poder visualizar la superficie del ventrículo en el tubo neural y poder observar alteraciones en el proceso de neurulación,

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Burton, B.S. (1882) On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetate. *Am Chem J* 1882;3: 385-395.

Calabresi, P., Galletti F., Rossi, C., Sarchielli, P. & Cupini, L.M. (2007) Antiepileptic drugs in migraine: from clinical aspects to cellular mechanism. *Trends Pharmacol. Sci.* 28:188-195.

Contreras, S.A. & Fabres, L.O. (2013) Epilepsia y mujer. *Rev Médica Clínica Las Condes*, 24(6), 928-937.

Dorado, C.; Rugerio, C. & Rivas, S. Estrés oxidativo y neurodegeneración (2003) *Rev. Fac. Med. UNAM*, 46(6):229-35.

Daton, G.P. (2011) Laboratory models and their role in assessing teratogenesis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 157(3): 183-187.

Folgueira, M., Bayley, P., Navratilova, P., Becker, T.S., Wilson, S.W., & Clarke, J.D. (2012) Morphogenesis underlying the development of the everted teleost telencephalon. *Neural Dev.* 7(1): 32.

Forsberg, L. & Wide, K. (2011) Long-term consequences after exposure to antiepileptic drugs in utero. *Ther Adv Drug Saf* 2(5):227-234.

Geldmacher-Voss, B., Reugels, A.M., Pauls, S. & Campos-Ortega, J.A. (2003) A rotation of the mitotic spindle changes the orientation of mitoses of zebrafish neuroepithelial cells. *Development (Cambridge, England)* 130(16): 3767-3780.

Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. & Métailler, R. (2002) *Nutrición y Alimentación de Peces y Crustáceos*. Ediciones Mundi-Prensa, 475 pp.

Hill, A. J., Hiroki T., Warren H. & Richard E. P. (2005) Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences*. 86(1):6-19.

Hill, D.S., Wlodarczyk, B.J., Palacios, A.M. & Finnell, R.H. (2011) Teratogenic effects of antiepileptic drugs. *Expert Rev Neurother* 10(6): 943-959.

Holmes, L.B., Baldwin, E.J., Smith, C.R., Habecker, E., Glassman, L., Wong, S.L., & Wyszynski, D.F. (2008) Increased frequency of isolated cleft palate in infants exposed to lamotrigine during pregnancy. *Neurology* 70 822): 2152-2158.

Kiener, T.K., Sleptsova-Fridrich, I. & Hunziker, W. (2007) Identification, tissue distribution and developmental expression of tjp1/zo-1, tjp2/zo-2 and tjp3/zo-3 in the zebrafish, *Danio rerio*. *Gene Expr Patterns* 7 (7): 767-776.

Kirkwood, J.S., Lebold, K.M., Miranda, C.L., Wright, C.L., Miller, G.W., Tanguay, R.L., Barton, C.L., Traber, M.G. & Stevens, J.F. (2012) Vitamin C deficiency Activates the Purine Nucleotide Cycle in Zebrafish. *J Biol Chem* 287(6): 3833-3841.

Marín, G.H., Cañas, M., Homar, C., Aimetta, C. & Orchuela, J. (2010) Uso de fármacos durante el periodo de gestación en embarazadas de Buenos Aires, Argentina. *Rev.salud pública* 12(5): 722-731.

Meador, K.J., Baker, G.A., Browning, N., Clayton-Smith, J., Combs-Cantrell, D.T., Cohen, M., Kalayjian, L.A., Kanner, A., Liporace, J.D., Pennell, P.B., Privitera, M., Loring, D.W., & For the NEAD Study Group (2010) Effects of breastfeeding in children of women taking antiepileptic drugs. *Neurology* 75(22): 1954-1960.

Navarová, J., Ujházy, E., Dubovicky, M. & Mach, M. (2005) Phenytoin induced oxidative stress in pre- and portnatal rat development- effect of vitamin E on selective biochemical variables. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 149(2): 325-328.

Nelson, J.S. (2006) *Fishes of the World*. 4th ed. Hoboken (New Jersey, USA): John Wiley & Sons.

Obican, S. & Scialli, A.R. (2011) Teratogenic exposures. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 157(3):150-169.

Ornoy, A. (2009) Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reprod. Toxicol.*, 28(1):1-10.

Sabers, A.; Bertelsen, F. C.; Scheel-Krüger, J.; Nyengaard, J. & Møller, A. (2014) Long-term valproic acid exposure increases the number of neocortical neurons in the developing rat brain. A possible new animal model of autism. *Neurosci. Lett.*, 580:12-6.

Schmitz, B., Papan, C. & Campos- Ortega, J.A. (1993) Neurulation in the anterior trunk region of the zebrafish *Brachydanio rerio*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 202: 250-259.

Włodarczyk, B.J., Palacios, A.M., George, T.M. & Finnell, R.H. (2012) Antiepileptic Drugs and Pregnancy Outcomes. *Am J Med Genet A* 158(8): 2071-2090.

Zerucha, T., Stuhmer, T., Hatch, G., Park, B.K., Long, Q., Yu, G., Gambarotta, A., Schultz, J.R., Rubenstein, J.L. & Ekker, M. (2000) A highly conserved enhancer in the Dlx5/Dlx6 intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between dlx genes in the embryonic forebrain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society Neuroscience* 20(2): 709-721.

2. La hipótesis de partida y los objetivos generales perseguidos.

HIPÓTESIS:

Como hipótesis del trabajo nos planteamos que el ácido valproico actúa como teratógeno debido a un aumento de las especies reactivas de oxígeno alterando el patrón de formación y desarrollo del tubo neural en los estadios embrionarios del pez cebra.

OBJETIVO GENERAL:

Nuestro objetivo general es comparar el desarrollo del tubo neural del pez cebra en presencia de ácido valproico y tras la adición de un antioxidante natural al medio (vitamina C).

3. Los objetivos específicos.

1. Caracterizar las alteraciones en el desarrollo del tubo neural tras la exposición a distintas concentraciones de ácido valproico en embriones de pez cebra transgénicos Tg (1.4dlx5a-dlx6a: GFP)^{ot1}.
2. Analizar si la administración de ácido valproico junto con la vitamina C disminuye significativamente los efectos teratogénicos causados por el ácido valproico en peces transgénicos Tg (1.4dlx5a-dlx6a: GFP)^{ot1}.
3. Comparar los resultados obtenidos en el pez cebra, *Danio rerio*, con los resultados disponibles en otras especies.

4. El detalle de la metodología propuesta.

4.1 Estudio de los efectos del ácido valproico en el desarrollo del tubo neural de embriones y larvas de pez cebra transgénicos Tg (1.4dlx5a-dlx6a: GFP)^{ot1}.

En este proyecto realizaremos un estudio de los defectos que causa el ácido valproico a distintas concentraciones en el desarrollo del tubo neural de embriones de pez cebra transgénicos Tg (1.4dlx5a-dlx6a: GFP)^{ot1}. Siguiendo las recomendaciones de la OCDE (2013), registraremos la mortalidad de los embriones y las malformaciones bajo un estereomicroscopio. Dado que el transgénico expresa la proteína verde fluorescente (GFP) en determinadas células del tubo neural, analizaremos también dichas poblaciones bajo un microscopio de fluorescencia. Posteriormente analizaremos la morfología del ventrículo mediante el marcaje inmunohistoquímico de la proteína ZO-1.

4.1.A. Obtención de los huevos fecundados de la línea transgénica Tg (1.4dlx5a-dlx6a: GFP)^{ot1}.

Para el presente proyecto, se utilizarán individuos adultos reproductores que pertenecen a la estirpe del transgénico Tg (1.4dlx5a-dlx6a: GFP)^{ot1} (Zerucha et al., 2000).

Tres días antes del desove, los machos y las hembras de la línea transgénica Tg (1.4dlx5a-dlx6a: GFP)^{ot1} del pez cebra serán alimentados con una dieta rica en proteínas para asegurar el rendimiento y la calidad de los huevos. La tarde anterior al día de la puesta, los ejemplares reproductores serán trasladados a peceras de cría donde se colocarán las hembras y machos en proporción 2:1. Para las peceras de cría utilizaremos el agua de los acuarios donde se mantienen los individuos.

Al día siguiente por la mañana, el primer estímulo luminoso tras el periodo de oscuridad desencadenará la liberación de los huevos y del espermatozoide. Los huevos fecundados se recogerán mediante un tamiz de malla de plástico y a continuación se analizan bajo un estereomicroscopio para determinar su calidad y número. Los huevos no fecundados, identificables en base a características morfológicas, se desecharán. Desde la etapa de 4 células en adelante los huevos fecundados pueden distinguirse inequívocamente por su transparencia de los huevos no fertilizados.

Tras seleccionar los huevos viables, los dispondremos en placas Petri con medio E3 autoclavado (5 mM de NaCl, 0.17 mM de KCl, 0.33 mM de CaCl₂ y 0.33 de MgSO₄).

4.1.B. Exposición de embriones Tg (1.4dlx5a-dlx6a: GFP)^{ot1} a ácido valproico.

Según la bibliografía disponible (Selderslaghs et al., 2009), las concentraciones de VPA requeridas para causar efectos teratogénicos oscilan entre 1-100 μM . Para la elección de las concentraciones a testar nos basamos en la bibliografía disponible. Las concentraciones de VPA se encontrarán por debajo de la LC_{50} (dosis letal media), la concentración de ácido valproico en agua que se estima letal para el 50% de los organismos del ensayo, y en el rango de la EC_{50} , que se define como la concentración de ácido valproico necesario en un medio para que se produzca un cierto efecto en el 50% de los organismos testados (Lee et al., 2013).

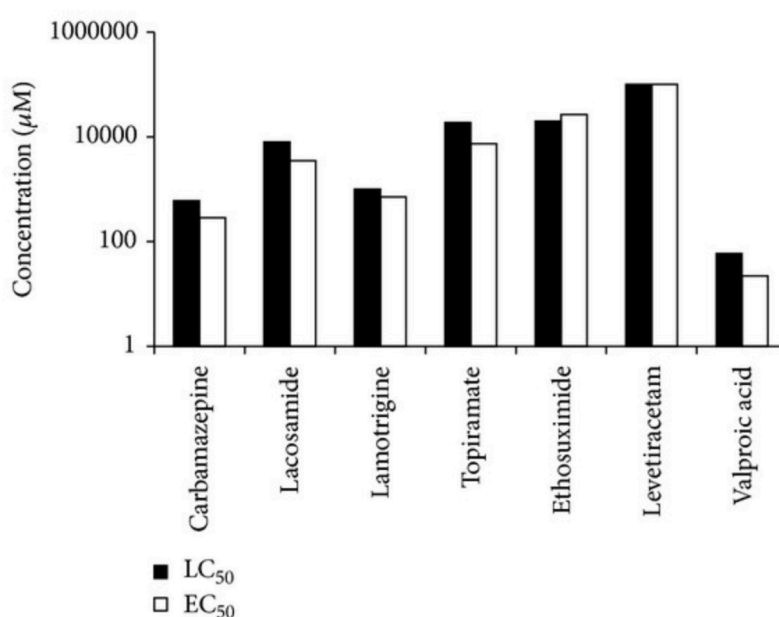


Figura 4: Efectos letales y teratogénicos de los principales anticonvulsivos (Lee et al., 2013).

Para determinar la sensibilidad de los embriones a dicha sustancia los exponemos a 4 concentraciones distintas: 5, 20, 50, 75 μM de ácido valproico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) preparadas en medio E3, comenzando 4 horas después de la fertilización continuamente hasta las 96 hpf. El diseño experimental se ha realizado basándose en el protocolo de la OCDE (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico) para el estudio de toxicidad en embriones de peces (Fish embryo acute toxicity test, FET) (OCDE, 2012). Los animales utilizados como control se mantienen en el medio E3 autoclavado.

Cada grupo experimental se compondrá de 20 embriones. El tamaño muestral ha sido establecido en base a la literatura disponible (Selderslaghs et al., 2009)

Los embriones se colocarán en placas de 24 pocillos, colocando un único embrión por pocillo. Se dispondrá de control negativo (medio E3 autoclavado) dentro de cada placa y de un control negativo independiente. Así mismo se realizará también un control positivo con 10 µg/mL de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NP, zinc oxide nanoparticles) con un tamaño inferior 50 nm, cuya letalidad en embriones de pez cebra ha sido confirmada (Zhu. et al., 2009; Bai et al., 2010).

Los embriones recolectados se mantendrán en un incubador con ciclo de 14 horas de luz/ 10 horas oscuridad. De cada concentración se realizará un mínimo de 3 réplicas.

4.1.C. Análisis del fenotipo de los embriones mediante la observación a estereomicroscopio.

Los embriones de cada concentración junto con los embriones controles serán evaluados a las 96 hpf. Los embriones se observarán bajo un estereomicroscopio para registrar cualquier anomalía en el patrón de desarrollo de los individuos. También se registrará la supervivencia de los embriones de los diferentes grupos experimentales (presencia movimiento y latido del corazón). Los embriones muertos serán registrados en una tabla de mortalidad por concentración y los vivos se evaluarán para determinar malformaciones. Los caracteres a evaluar serán: el tamaño de la cabeza, si presentan el eje axial torcido y la longitud del tubo neural de los embriones.

Para los datos de mortalidad y malformaciones del tubo neural obtenidos de los bioensayos se aplicará un diseño aleatorizado con igual número de réplicas, empleando la prueba de Chi Cuadrado (χ^2), con el fin de comparar la mortalidad del grupo control y los grupos experimentales. Además, se realizarán gráficas comparando la presencia de malformaciones según la concentración de los diferentes tratamientos.

4.1.D Estudio del fenotipo tras inmunofluorescencia frente a GFP y ZO-1.

Tras finalizar el periodo de exposición a las 96 horas, se analizará el número y localización de las células que expresan GFP para las diferentes concentraciones de VPA y el control. Esto podría poner en evidencia malformaciones no visualizadas al analizar la morfología general de los embriones y larvas (apartado anterior). Así mismo se estudiará la localización del marcador apical ZO-1 para detectar alteraciones en el tubo neural. Para ello las larvas se fijarán y se procederá a una tinción inmunohistoquímica con anticuerpos primarios dirigidos frente a las GFP y la ZO-1, tal como se describe a continuación.

Las larvas se anestesiaron en etil-3-aminobenzoato metanosulfonato al 0.03% y se fijaron con paraformaldehído al 4% y pH 7.4 durante 5 horas a temperatura ambiente. A continuación, se llevarán a cabo lavados con tampón fosfato salino y las larvas se mantendrán en metanol a -20°C hasta su uso.

Para continuar con el procesamiento de las muestras, las larvas almacenadas en metanol a -20°C se mantendrán a temperatura ambiente 10 min. Seguidamente rehidratamos las muestras en diluciones sucesivas de metanol/TFS (75, 50 y 25%) durante 5 min en cada dilución. Y finalmente cuatro lavados de 5 minutos en TFS con tritón al 0.5% (TFS-T). Incubaremos durante 1 hora en suero normal de cabra (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 2,5% en TFS y a continuación 24 horas con los anticuerpos primarios [conejo anti- GFP (dilución, Sigma-Aldrich) y ratón anti- ZO1 (dilución 1:300, Sigma-Aldrich)] diluidos en solución de bloqueo (suero normal de cabra al 2,5% en TFS). Al día siguiente, lavaremos los embriones en TFS 1% y se incubarán durante una hora con los anticuerpos secundarios fluorescentes [cabra anti-conejo Alexa Fluor 488 (dilución 1:500; Invitrogen) y cabra anti-ratón Alexa Fluor 568 (dilución 1:500, Invitrogen)] y en solución de bloqueo 2,5%. Luego lavaremos las muestras con TFS durante 5 minutos (3 lavados). Las larvas serán montadas en posición dorsal en agarosa al 3%.

Las secciones se observarán utilizando un microscopio de fluorescencia el cual está acoplado a una cámara digital (Olympus DP71). Posteriormente elegiremos un individuo de cada concentración y realizaremos un estudio más minucioso bajo un microscopio de barrido láser confocal.

4.2. Estudio de los efectos del ácido valproico en el tubo neural de embriones y larvas de pez cebra transgénicos Tg (1.4dlx5a-dlx6a: GFP) al añadir al medio un antioxidante natural (vitamina C).

Del estudio previo (apartado 4.1) elegiremos dos de las concentraciones de VPA que produzcan más anomalías significativas causen en el desarrollo del tubo neural del pez cebra. A continuación, analizaremos si la administración de vitamina C junto con VPA a dichas concentraciones disminuye significativamente las malformaciones en el tubo neural.

Tomaremos grupos de 20 individuos que dispondremos en placas de 24 pocillos, un embrión por pocillo. Estos grupos los expondremos a las concentraciones de VPA seleccionadas junto a 200 μ M de vitamina C. La concentración a la que expondremos a los embriones de vitamina C ha sido elegida basándonos en el artículo de Francis et al. (2011). Contaremos con un control negativo (medio E3 autoclavado), otro control negativo (medio E3 autoclavado más vitamina C) y un control positivo 10 μ g/mL de nanopartículas de óxido de zinc en la placa de 24

pocillos y un control negativo independiente. Realizaremos un mínimo de 3 réplicas por concentración.

La exposición durará 96 horas y tras este periodo, las larvas de pez cebra se someterán al estudio de la morfología en general bajo estereomicroscopio y del estudio detallado del tubo neural al microscopio de fluorescencia tras el estudio inmunohistoquímico de ZO-1 y GFP.

Después del estudio del fenotipo de las larvas expuestas a vitamina C durante su crecimiento, compararemos los resultados con el estudio anterior y estudiaremos si existen diferencias significativas entre los grupos tratados solo con ácido valproico y con los grupos que se han desarrollado en presencia de un antioxidante, tanto a nivel de expresión de ZO-1 y GFP como del fenotipo.

5. La descripción de los medios materiales, infraestructuras y equipamientos singulares.

Este proyecto se llevará a cabo en el Laboratorio del grupo Neurover en el Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA, Universidad de A Coruña). Dicho laboratorio estará provisto de todos los materiales e infraestructuras necesarios para la realización del proyecto, tal y como se detalla a continuación.

5.1. Mantenimiento de los peces progenitores.

Los peces cebra progenitores serán alojados en un sistema de acuarios Aquaneering Inc. (San Diego, CA) con un espacio suficiente para su desplazamiento (> 1 L por pez). Los individuos se mantendrán a una temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ y en un ciclo artificial de 14 horas de luz/ 10 horas oscuridad. Habrá unas condiciones de flujo y filtrado de agua permanente para que las concentraciones de amoníaco, nitrito y nitrato se mantengan por debajo de los límites perjudiciales para su desarrollo (0-5, 0.025-1 y 0-140 mg/L respectivamente).

El agua de las peceras será tratada mediante un proceso de decoloración y limpieza mediante una membrana de ósmosis inversa, un filtro físico y otro de carbón activo. Se ajustarán los parámetros óptimos de concentración de cloro, dureza, oxígeno disuelto y conductividad para esta especie (Westerfield, 2007).

Los peces se alimentarán dos veces al día con escamas comerciales (TetraMin®) suplementadas con nauplios de Artemia obtenidos de una fuente no contaminada. La alimentación estará bien controlada para evitar una sobrealimentación.

5.2. Microscopio de fluorescencia y microscopio confocal.

Para el análisis de los resultados de la inmunofluorescencia frente GFP y ZO-1 utilizaremos un microscopio de fluorescencia Nikon E1000 (laboratorio Neurover, Universidad de A Coruña) y un microscopio de barrido láser confocal (Nikon A1R, Servicios de Apoyo a la Investigación, Universidad de A Coruña). La configuración del confocal, incluyendo la potencia del láser, la ganancia, offset, apertura del “pinole” y el promedio serán establecidos al comienzo de la toma de imágenes y se mantendrán sin cambios durante todo el proceso. Todos los embriones serán fotografiados el mismo día y con los mismos parámetros de z-stack (25 z-slices a intervalos de 3 μm).

6. Un cronograma claro y preciso de las fases e hitos previstos en relación con los objetivos planteados en la propuesta.

La realización de este proyecto será llevada a cabo por el grupo de investigadores Neurover (Universidad de A Coruña). Formado por tres investigadores contratados a tiempo completo y un becario predoctoral. Este proyecto está estipulado para una duración de 3 años.

	PRIMER AÑO												SEGUNDO AÑO												TERCER AÑO														
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D			
1. CRÍA DE LOS INDIVIDUOS REPRODUCTORES																																							
2.OBTENCIÓN DE LOS EMBRIONES																																							
3.EXPOSICIÓN DE LOS EMBRIONES A VPA																																							
ESTUDIO DEL FENOTIPO (ESTEREOMICROSCOPIO)																																							
INMUNOHISTOQUÍMICA																																							
ESTUDIO DEL FENOTIPO (MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA)																																							
ANALISIS DE LOS DATOS																																							
4.EXPOSICCIÓN DE LOS EMBRIONES A VPA + VITMAMINA C																																							
ESTUDIO DEL FENOTIPO (ESTEREOMICROSCOPIO)																																							
INMUNOHISTOQUÍMICA																																							

B. IMPACTO ESPERADO DE LOS RESULTADOS

1. Descripción del impacto científico-técnico social y/o económico que se espera de los resultados del proyecto, tanto a nivel nacional como internacional.

Nuestro proyecto de investigación presenta un claro impacto potencial a nivel científico-técnico en el campo de la biología del desarrollo tanto a nivel nacional como internacional. La biología del desarrollo se enfrenta actualmente a desafiantes retos con importantísimas repercusiones biomédicas. En este proyecto evaluaremos e intentaremos conocer los mecanismos por los cuales un medicamento de uso terapéutico puede afectar al desarrollo embrionario, llegando a producir malformaciones muy variadas en el tubo neural ya registradas en seres humanos.

Si existen evidencias significativas de una disminución de las malformaciones en el tubo neural al añadir al tratamiento con VPA el antioxidante vitamina C, esto podrá tener importantes repercusiones médicas en un futuro. Se abriría una línea de investigación para evaluar la existencia de dicho efecto en mamíferos, primero en modelos murinos y posteriormente en animales superiores. Esto podría implicar una mejora en los tratamientos con VPA durante el embarazo en un futuro, siendo suficiente una dieta rica en antioxidantes para minimizar los efectos teratogénicos del VPA. Además, al entender el mecanismo por el cual el VPA induce la teratogenidad se podrán realizar nuevos estudios y modificaciones en el medicamento para poder evitar dicha acción teratogena, sin modificar sus propiedades altamente efectivas como anticonvulsionante.

2. El plan de difusión e internacionalización en su caso de los resultados.

La difusión de los resultados se llevará a cabo a través de estas vías principales:
- Comunicaciones en Congresos, Simposios y Workshops de índole nacional e internacional como pueden ser: European Zebrafish Meeting y el International Zebrafish Meeting.

-Difusión de los resultados a través de distintas asociaciones de epilepsia a nivel nacional o a nivel internacional. La Federación Española de Epilepsia (FEDE) puede ayudarnos a difundir la noticia a través de las actividades que realiza o mediante la publicación de los resultados en su página web. A nivel internacional se pueden difundir los resultados a través de la American Epilepsy Society (AES).

-Publicación de artículos de investigación con los resultados del proyecto, en revistas científicas de nivel internacional como Neurology y The Journal of Neuroscience. Si estos resultados tienen alguna repercusión médica también se

publicarían artículos científicos en las revistas médicas más importantes como The New England Journal of Medicine o JAMA (The Journal of the American Medical Association)

-Creación de una página web donde se publicarán los resultados y realización de conferencias divulgativas y artículos divulgativos.

Los resultados serán publicados en Open Access y en su defecto se publicará en el RUC de la UDC.

3. Si se considera que puede haber transferencia de resultados, se deberán identificar los resultados potencialmente transferibles y detallar el plan previsto para la transferencia de los mismos.

El resultado transferible ante el que nos encontraríamos sería el efecto protector de la vitamina C ante las especies reactivas de oxígeno. Esto no solo sería útil para proteger al feto del efecto teratogénico del VPA, sino que también podría utilizarse como agente protector en muchas otras enfermedades causadas por el estrés oxidativo.

Durante el desarrollo de este proyecto, habrá una transferencia de resultados a grupos de investigación de diferentes universidades que puedan estar interesados en los resultados.

Además, si los resultados son satisfactorios podríamos proteger con una patente el efecto de la vitamina C como agente protector ante las especies reactivas del oxígeno en el organismo.

Los resultados también podrían ser transferidos a una empresa farmacológica de tal manera que utilicen el efecto protector de la vitamina C contra el estrés oxidativo para el desarrollo de fármacos, tanto para la protección contra el VPA como para otras muchas enfermedades que se relacionen con un incremento de las especies reactivas de oxígeno.

C. IMPLICACIONES ÉTICAS Y/O DE BIOSEGURIDAD

1. Una descripción de los aspectos éticos referidos a la investigación que se propone.

El presente proyecto implica la utilización del pez cebra (*Danio rerio*), animal incluido en el Anexo I el RD 53/2013 “por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia”. Dicha normativa nacional se basa en la Directiva Europea 2010/63/UE para la protección de los animales utilizados para fines científicos.

El proyecto contará con las autorizaciones pertinentes, incluida la del comité de ética de la Universidad de A Coruña. Se aplicarán en todo momento y siempre que sea posible los principios de reemplazo, reducción y refinamiento que recomienda la legislación nacional y europea. Así mismo, durante el desarrollo del proyecto se respetarán las condiciones de salud, entorno y bienestar especificadas en el anexo II de RD53/2013. Todo el personal que trabajará con el pez cebra estará capacitado siguiendo el art. 14 y 15, así como debidamente acreditados con la autorización correspondiente según el art. 16 y 17 del RD53/2013.

2. Una explicación de las consideraciones, procedimientos o protocolos a aplicar en cumplimiento de la normativa vigente, así como una descripción de las instalaciones y las preceptivas autorizaciones de las que se dispone para la ejecución del proyecto.

Según la normativa nacional y europea, el proyecto no implica la aplicación de procedimientos (el mantenimiento y cría de peces, así como los estudios toxicológicos realizados hasta las 96 horas post-fecundación no se consideran procedimientos). Para la eutanasia de animales se seguirán las recomendaciones de la normativa para pez cebra (anexo III)

El proyecto se evaluará según lo establecido en el art.34 del RD 53/2013 realizando una evaluación del proyecto por parte de los órganos habilitados al respecto, incluyendo el comité de ética de la Universidade da Coruña.

Se cumplirán todos los requisitos del Anexo II (RD 53/2013) para garantizar el bienestar del pez cebra, asegurando lograr su reproducción y poder usar los embriones en esta investigación, sin riesgo de causar daño o sufrimiento alguno al animal. Para garantizar el cumplimiento de dichos requisitos se establecerá un órgano encargado del bienestar de los animales (OEBA), cuyas funciones

establece el art.38 (RD 53/2013). Las instalaciones donde se mantendrán los adultos reproductores cumplirán las normas generales establecidas en la sección A del anexo II así como las particulares del pez cebra especificadas en la sección B (RD 53/2013): correcto suministro de agua en condiciones óptimas de temperatura, vigilando pH, conductividad y compuestos nitrogenados. Se colocarán un máximo de 100 ejemplares por cada 100 L de agua, pero para evitar un estrés excesivo lo ideal será colocar 50 peces cada 100 L. Los alevines al tener un tamaño muy inferior que los adultos, se colocarán una media de 50 ejemplares cada 11 L. La dieta constará de dos tipos de comida, una es la comida viva y la otra la comida procesada. La dieta viva incluye algunas especies de zooplancton, como por ejemplo larvas de *Artemia salina*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Bai, X., Kim, J., Yang, Z., Jurynek, M.J., Akie, T.E., Lee, J., LeBlanc, J., Sessa, A., Jiang, H., DiBiase, A., Zhou, Y., Grunwald, D.J., Lin, S., Cantor, A.B., Orkin, S.H., & Zon, L.I. (2010) TIF1gamma controls erythroid cell fate by regulating transcription elongation. *Cell* 142(1): 133-143.

Emmanouil-Nikoloussi, E. N., Foroglou, N. G., Kerameos-Foroglou, C. H. & Thliveris, J. A. (2004) Effect of valproic acid on fetal and maternal organs in the mouse: a morphological study. *Morphologie*, 88(280):41-5.

Folgueira, M., Bayley, P., Navratilova, P., Becker, T.S., Wilson, S.W. & Clake, J.D. (2012) Morphogenesis underlying the development of the everted teleost telencephalon. *Neural Development* 7(1): 32.

Francis, S., Delgoda, R. & Young, R. (2012) Effects of embryonic exposure to α -lipoic acid or ascorbic acid on hatching rate and development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture Research*, 43: 777–788.

Komoike, Y., Matsuoka, M. (2016) Application of Zebrafish Model to Environmental Toxicology. *Nihon Eiseigaku Zasshi* 71: 227-235.

Lee, S.H., Kang, J.W., Lin, T., Lee, J.E. & Jin, D.I. (2013) Teratogenic Potential of Antiepileptic Drugs in the Zebrafish Model. *BioMed Research International*, Article ID 726478, 6.

OCDE (2012) Guideline for the testing of Chemicals. Draft Proposal for a New Guideline. Fish Embryo Toxicity (FET) Test.

Panzica-Kelly, J.M., Zhang, C.X., and Augustine-Rauch, K. (2012) Zebrafish embryo developmental toxicology assay. *Methods Mol Biol* 889: 25-50.

Rojas-Muñoz A, Miana AB & Izpisúa-Belmonte JC. (2007). El pez cebrá, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Investigación y ciencia*. 366: 62-69.

Selderslaghs, I.W., Van Rompay, A.R., De Coen, W. & Witters, H.E. (2009) Development of a screening assay to identify teratogenesis and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reprod Toxicol* 28(3): 308-320.

Terbach, N., Shah, R., Kelemen, R., Klein, P.S., Gordienko, D., Brown, N.A., Wilkinson, C.J., & Williams, R.S. (2011) Identifying an uptake mechanism for the antiepileptic and bipolar disorder treatment valproic acid using the simple biomedical model *Dictyostelium*. *J Cell Sci* 124(Pt 13): 2267-76.

Tsai, L. K.; Tsai, M. S.; Ting, C. H. & Li, H. (2008) Multiple therapeutic effects of valproic acid in spinal muscular atrophy model mice. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 86(11):1243-54.

Westerfield, M. (2007) *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 5th Edition. University of Oregon Press, Eugene.

Zerucha, T., Stuhmer, T., Hatch, G., Park, B.K., Long, Q., Yu, G., Gambarotta, A., Schultz, J.R., Rubenstein, J.L. & Ekker, M. (2000) A highly conserved enhancer in the Dlx5/Dlx6 intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between dlx genes in the embryonic forebrain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society Neuroscience* 20(2): 709-721.

Zhu, P., Narita, Y., Bundschuh, S.T., Fajardo, O., Schärer, Y.P., Chattopadhyaya, B., Bouldoires, E.A., Stepien, A.E., Deisseroth, K., Arber, S., Sprengel, R., Rijli, F.M., & Friedrich, R.W. (2009) Optogenetic Dissection of Neuronal Circuits in Zebrafish using Viral Gene Transfer and the Tet System. *Front. Neural Circuits* 3: 21.

D.CONCLUSIONES O HITOS QUE SE PRETENDEN ALCANZAR.

Con el presente proyecto se pretende demostrar la viabilidad de uso del pez cebra como organismo modelo en biología del desarrollo, centrándonos en estudiar los efectos en el desarrollo de un medicamento teratogénico, el ácido valproico.

De esta manera, la exposición de los embriones a las distintas concentraciones del ácido, nos permitirá observar, a nivel fenotípico y molecular, las alteraciones que causa la medicación en el desarrollo del tubo neural.

Basándonos en la hipótesis de que la teratogenicidad de este anticonvulsivo es causada por el aumento de las especies reactivas de oxígeno y/o disminución de los complejos antioxidantes, realizaremos un estudio paralelo donde añadiremos al medio vitamina C, un antioxidante natural. Si esta hipótesis es cierta, los efectos teratogénicos del ácido valproico serán disminuidos en la presencia de esta vitamina.

CONCLUSIÓNS OU FITOS QUE SE PRETENDE ALCANZAR

Co presente proxecto pretendese demostrar a viabilidade do uso do peixe cebra como organismo modelo en bioloxía do desenvolvemento, centrándonos en estudar os efectos no desenvolvemento de un medicamento teratóxeno, o ácido valproico.

De esta maneira, a exposición dos embrións ás distintas concentracións do ácido, permitiranos observar, a nivel fenotípico e molecular, as alteracións que causa a medicación no desenvolvemento do tubo neural.

Baseándonos na hipótese de que a teratoxeneidade de este anticonvulsivo é causada polo aumento das especies reactivas de osíxeno e/o a diminución dos complexos antioxidantes, realizaremos un estudo paralelo onde engadiremos ó medio vitamina C, un antioxidante natural. De ser certa esta hipótese, os efectos do ácido valproico serán diminuídos na presenza de esta vitamina.

CONCLUSIONS OR MILESTONES TO BE ACHIEVED

The present project aims to demonstrate the feasibility of using the zebrafish as a model organism in developmental biology, we focus on studying the effects on the development of a teratogenic drug, valproic acid.

In this way, the embryos' exposure to various concentrations of valproic acid, lend us see, at phenotypic and molecular level, the alterations caused by the medication in the development of the neural tube.

Based on the teratogen's hypothesis of this anticonvulsant is caused by the increase of the reactive oxygen species and/or the decrease of the antioxidant complex, we will conduct a parallel study where we will add vitamin C, a natural antioxidant. If this hypothesis is true the valproic acid's teratogenic effects will be diminished in the presence of this vitamin.